ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202211.00331v1

云南金铁锁根腐病病原菌的分离及鉴定

杨文婷，张晓梅，李国栋，李俊楠，杨承凡，张爱丽*

（云南中医药大学 中药学院，云南省高校中医药学分子生物学重点实验室/暨云南省南药可持续利用研究重点实验室，昆明 650500）

摘　要：金铁锁(*Psammosilene tunicoides*)是西南地区重要的民族民间药物，是云南白药等中成药的主要原料药。该研究旨在分离并鉴定云南金铁锁根腐病病原菌，为金铁锁根腐病的诊断和防治提供理论基础。该研究采用微生物纯培养方法，分离纯化金铁锁根腐病植株根部的病健交接处组织，获得金铁锁根腐病病原微生物。按照 Koch' s 法则验证分离得到的病原菌的致病性。结合形态学观察、真菌 rDNA-ITS 和 TEF-1α序列分析以及系统发育树的构建鉴定获得的病原菌的种类。结果表明：(1)从金铁锁根腐病植株组织中分离纯化得到 85 株真菌，其中 PSD-1，PSD-2，PSD-3 菌株均能引起金铁锁的根腐病；(2)健康植株接种 PSD-1，PSD-2，PSD-3 菌株后，产生与大田植株根腐病相似的症状，且发病率分别为 60%，61.7%，71.7%；(3)结合形态学观察及基因序列分析，鉴定该三株菌株均为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。上述结果首次报道了尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)是引起金铁锁根腐病的主要致病原菌之一，为深入探究具有根腐病生物防治功能的内生菌群及其作用机制奠定基础，为后续金铁锁病害的防治工作提供理论依据。

关键词：金铁锁，根腐病，分离，鉴定，尖孢镰刀菌

Isolation and identification of pathogens causing root rot disease of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan Province

YANG Wenting, ZHANG Xiaomei, LI Guodong, LI Junnan,
YANG Chengfan, ZHANG Aili*

（*Yunnan Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Sinomedicine /Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine,* Kunming 650500, China）

Abstract: *Psammosilene tunicoides* is an important ethnic medicine in Southwest China and the main raw material for Chinese patent medicines such as Yunnan Baiyao. The purpose of this study was to isolate and identify the pathogenic fungus of root rot of *P. tunicoides* in Yunnan, and to provide a theoretical basis for the diagnosis and prevention of root rot of *P. tunicoides*. In this study, the disease-health junction of the root tissue of diseased plant was isolated and purified by pure culture method to obtain the main pathogenic microorganisms of *P. tunicoides*. Isolated pathogenic microorganisms were analyzed the pathogenicity according to Koch's Postulates, and then were identified by morphological observation, rDNA-ITS and TEF-1α sequence analysis and phylogenetic tree construction. The results were as follows: (1) A total of 85 strains of fungi were

基金项目：国家自然科学基金(81560613)；国家自然科学基金(81960693)；云南省科技厅-云南省应用基础研究项目(202101AT070600)；云南省科技人才和平台计划(202105AG070012) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant number: 81560613; 81960693), Yunnan Province Applied Basic Research Program (Grant number: 202101AT070600), Yunnan Province Science and Technology Talent and Platform Program (Grant number: 202105AG070012)]。

第一作者：杨文婷(1997-)，硕士研究生，主要从事中药资源开发与利用研究，(E-mail) 1451466739@qq.com。

***通信作者：**张爱丽，博士，副教授，主要从事中药资源开发与分子生物学研究，(E-mail) yunnanzhongyi@hotmail.com。

obtained, among which PSD-1, PSD-2, and PSD-3 of *Fusarium* fungi caused *P. tunicoides* root rot; (2) These three strains were re-inoculated into the *P. tunicoides*, which produced similar disease symptoms occurred with field plants, and the disease incidence after inoculation with pathogenic fungi were 60%, 61.7%, and 71.7%, respectively; (3) Combined with morphological observation and gene sequence analysis, the three strains were identified as *Fusarium oxysporum*. This study firstly found that the *F. oxysporum* was one of the main pathogenic fungi causing root rot of *P. tunicoides*. The results of this study lay a foundation for the in-depth exploration of the endophytic flora with biological control of root rot and its mechanism, and serve as a theoretical basis for the follow-up prevention and control of the disease.

Keywords: *Psammosilene tunicoides*, root rot, isolation, identification, *Fusarium oxysporum*

根腐病是一类具有容易传染、发病率高、防治困难等特点的根部病害，在根和根茎类药用植物中的发病率较高(陈茂婷等，2020)。据报道，引起植物根腐病的病原菌主要为镰刀菌属真菌(穆向荣等，2014；伍晓丽等，2020；曹敏，2022)。镰刀菌是一类世界性分布的真菌，可通过破坏植物体结构，侵染多种植物根、茎及果实等部位，引起根腐病、茎腐病和穗腐病等多种病害(谢安娜等，2020)。由镰刀菌引起的多种土传病害也正威胁我国三七、人参、黄芪、半夏、川芎、麻黄等重要中药材的种植生产(朱春雨等，2003；李佳穗等，2015；文增叶等，2019；张静等，2019；姚天明等，2020；Li et al., 2021)。目前，国内外研究关于镰刀菌分类地位、形态学与分子学特征、致病性与致病机理及生物防治等方面均有报道(高芬等，2018；梁嘉俊等，2019)。由于镰刀菌属形态复杂，易受外界环境影响而发生变异，因此，通过形态学特征很难准确地鉴定镰刀菌种类，影响了后续防治等工作的开展。随着分子生物学技术的发展，形态学结合 DNA 分子片段分析等手段能更加有效地提高镰刀菌种类鉴定的准确性(王世伟等，2018)。内转录间隔区(internal transcribed spacer，ITS)、线粒体小亚基核糖体(mitochondrial small subunit rDNA，mtSSU)、β-微管蛋白(β-tubulin)及翻译延伸因子(nuclear translation elongation factor-1α，TEF-1α)等 rDNA 片段已被广泛地用于镰刀菌种类的鉴定(Sampietro et al., 2010)。其中核糖体 DNA (rDNA)和 TEF-lα延伸因子两类基因位点常用于进行镰刀菌属的种属鉴定(Tapani et al., 2002)。其中，rDNA 是鉴定镰刀菌的理想方法，其最大优点是既具有保守性，又存在变异性。作为真核生物多肽链延伸因子，TEF-1α在种水平上具丰富信息量，较 ITS 序列有更多的种间变异，具有高分辨力。其可与 ITS 序列联合分析，提高对镰刀菌鉴别的准确性。

金铁锁(*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu)是石竹科(Caryophyllaceae)金铁锁属植物，首载于《滇南本草》(兰茂，2004)，主要分布在云南、贵州、西藏等省(朱常成等，2007)。金铁锁以根入药，主治跌打损伤、风湿、痈疽疮疖、创伤出血等(胡成刚等，2002)。在苗族、彝族、白族等少数民族中有着悠久的用药历史，其有效成分为齐墩果烷型三萜皂苷类化合物，在镇痛抗炎、调节免疫、杀菌抑菌等方面具有较好的作用(王学勇等，2006；周欣等，2013)，是"云南白药"等多种著名中成药的主要原料药物之一(周祖英等，2021)。近年来，由于长期的采挖，金铁锁野生资源急剧减少(朱常成和尹子丽，2017)，现已被列为国家二级保护植物，被《中国植物红皮书》收录(傅立国，1991)。

目前，云南大部分地区都有种植金铁锁(吕金富等，2018；罗映菊，2018)。课题组前期对曲靖马龙、玉溪华宁、大理剑川及丽江华坪等云南各地区金铁锁栽培基地进行了走访调查，发现二、三年生的金铁锁在 7-8 月雨季时极易发生根腐病，多年的连作方式使土壤中的病原菌积累，导致土壤环境复杂，根腐病害的发生逐年加重，农户因怕遭受病害导致损失而采挖一年生的金铁锁，但一年生金铁锁因栽培年限不够又导致药材浸出物检验不合格(杨丽云等，2020)，极大地影响了金铁锁药材品质，很大程度上限制了云南白药等企业对金铁锁资源的开发及利用。然而，目前未见金铁锁根腐病的相关报道，严重影响了其防治工作的开展。鉴于此，该研究结合形态学观察及基因序列分析系统地鉴定了金铁锁根腐病的致病菌，首次发现

chinaXiv:202211.00331v1

尖孢镰刀菌是引起金铁锁根腐病的主要病原菌之一，研究结果为下一步开展金铁锁根腐病生物防治功能菌株资源的挖掘奠定了基础，以及金铁锁的病害诊断和防治提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料：金铁锁病害样品及健康植株(健康样品和病害样品都为二年生金铁锁植株的根)于2020年11月采集于云南马龙，该地年平均气温10~21 ℃，年平均降水量979.6~1 001.8 mm。该金铁锁栽培基地的土质疏松肥沃，为金铁锁提供了良好的生长条件。金铁锁组培苗来自云南中医药大学中药材优良种苗繁育工程中心。

主要试剂和仪器：马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(Solarbio，生产批号为428G031)，马铃薯葡萄糖肉汤(PDB) (Solarbio，生产批号为601Y031)，萘啶酮酸(Solarbio，生产批号为Y77408)，Taq酶(Takara，生产批号为AL52014A)，真菌DNA小量提取试剂盒(Magen，生产批号为DKI09-01)。立式高压灭菌锅(Uniclave，FD50A型号)，超净工作台(苏净安泰，SW-CJ-FD型号)，生化培养箱(Bluepard，LRH-70型号)，生物显微镜(Nikon，ECLIPSE E100型号)。测序引物由擎科生物(上海)科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化

取有根腐病症状的根的病健交界处组织，在5%NaClO中表面消毒1.5 min，然后在75%酒精中表面消毒1.5 min，无菌水冲洗2~3次，无菌滤纸吸干水分，用无菌剪刀在根样品的病健交接处剪1/3指甲盖大小的组织，将有切口的一面贴到含50 mg • L^{-1}萘啶酮酸的PDA培养基上(50 mg • L^{-1}萘啶酮酸可选择性抑制细菌生长)，并在28 °C下培养2~3 d，待染病组织块周围长出菌丝时，用接种针挑取菌落边缘尖端菌丝进行纯化，并观察菌落形态。多次纯化后的菌株根据菌落大小、形态、颜色等特征去重复后接种于PDA斜面-4 ℃保存。

1.2.2 致病性测定

1.2.2.1 病原菌分生孢子悬浮液的制备

将保留的菌种在PDA平板上活化后转接至PDB培养基中，放在摇床上28 °C培养7 d，然后将液体培养基中培养好的菌株用4层纱布过滤除去菌丝，5000 rmp离心10 min后，弃上清液，取沉淀物加入适量的无菌水摇匀，制备成浓度约为$1.0{\times}10^6$ cfu • mL^{-1}的孢子悬浮液备用。孢子悬浮液的浓度采用血球计数板法计算(张继忠和王薇，2018)。

1.2.2.2 病原菌的回接

(1) 组培苗接种病原菌：提前准备好金铁锁组培苗，每个组培瓶里应具有10个以上的金铁锁根。使用注射器往金铁锁组培苗的须根周围接种5 mL分生孢子悬浮液，重复接种6瓶；对照组采用同样方法接种5 mL无菌水，重复接种6瓶，然后室温中培养，观察组培瓶内金铁锁组培苗的变化，连续观察1个月。

(2) 盆栽接种病原菌：前期把采回的二年生金铁锁移栽置塑料花盆(直径19 cm，高19 cm)内。采用浸泡法接种，将健康金铁锁的根置于培养皿中，往培养皿中注入分生孢子悬浮液，浸泡0.5~1 h后倒去分生孢子悬浮液，处理后的根立即种于装有灭菌土的塑料花盆内，覆土。对照处理用无菌水浸泡相同时间后立即栽种。重复用分生孢子悬浮液接种60株金铁锁，然后正常的管理培养。培养期间，观察盆栽中金铁锁苗的生长状况，待叶片枯黄脱落后挖出金铁锁根，观察其是否烂根。从发病植株的病健交界处再次进行病原菌分离，验证病原菌的致病性。

1.2.3 病原菌的鉴定

(1) 形态学鉴定

将菌株接种于PDA培养基上进行活化，期间观察PDA培养基上的菌落的形态特征(大小，颜色，形状变化)，并用接种针挑取少量菌丝放置于载玻片上，加入几滴无菌水，盖上盖玻片

chinaXiv:202211.00331v1

制成临时装片，采用 Nikon 生物显微镜，在 1 000 倍镜下观察分生孢子的形状、大小、厚垣孢子的有无及着生方式。

(2) 分子生物学鉴定

将病原菌接种到 PDA 培养基上，待菌丝长至旺盛，挑取适量菌丝体于 1.5 mL 无菌管中，采用真菌 DNA 小量提取试剂盒进行病原菌 DNA 提取。对病原菌 DNA 进行内转录间隔区(internal transcribed spacer，ITS)和转录延伸因子-1α(transcription elongation factor-1α，TEF-1α)的扩增。引物名称及序列：ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)；EF1α-EF (GCTCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT)/EF1α-ER (ATGACACCRACRGCRACRGTYTG)。反应体系(50 μL)：Takara Premix Taq 扩增酶 45 μL，正向引物(10 μmol/L) 2 μL，反向引物(10 μmol/L) 2 μL，DNA 模板 1 μL。反应条件：98 ℃ 预变性 2 min；98 ℃变性 10 s，ITS 56 ℃ (TEF-1α 54 ℃) 退火 10 s，72 ℃延伸 (根据片段长度按照 10 s·kb^{-1} 进行设置)，30 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经凝胶电泳检测后委托擎科生物(上海)科技有限公司进行测序。将测序结果与 NCBI 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对，使用 MEGA 5.0 (Koichiro Tamura, et al., 2011)将序列拼接起来，采用贝叶斯法(Bayesian Inference，BI)对病原菌进行多基因(TEF-1α和 ITS)联合建树的方法构建系统发育树(Ronquist Fredrik & John P. Huelsenbeck, 2003; Maharachchikumbura, et al., 2012)。

2 结果

2.1 金铁锁根腐病症状

前期我们对金铁锁栽培基地的调研发现，金铁锁根腐病的叶片症状很难见到，一般根腐病发生后，植株叶片早已经完全枯萎脱落，导致我们采样时很难在田间见到金铁锁感染根腐病后的地上部分症状。实验室进行金铁锁染菌试验后，发现感染根腐病后的金铁锁叶片会脱绿，逐渐黄化，直至枯萎、脱落、死亡。金铁锁根部变化首先是根表皮萎缩，暗黄色加深直至变为黑褐色，之后软化，根部开始从根尖慢慢向根上部开始腐烂，表面有时会长出白色丝状物，可能是病原菌的菌丝(图 1)。



A. 田间完全腐烂的根；**B.** 田间部分腐烂的根；**C.** 根部病健交接处的组织。

A. Completely rotten roots in the field; **B.** Partially rotten roots in the field; **C.** Tissue at the junction of disease and health at the root.)

图 1 金铁锁根腐病的症状

Fig.1 Symptoms of *P. tunicoides* root rot

2.2 金铁锁根腐病病原菌的分离及纯化

对金铁锁根腐病的根系组织进行分离及纯化，纯化后共得到 85 株真菌，85 株真菌的菌落在 PDA 培养基上总共呈现三种形态(图 2)：第一种绒毛蓬松，轮纹状，布满整个培养基，白色(图 2：A)；第二种呈绒毛状较贴培养基，形状不规则，白色(图 2：B)；第三种有轮纹状，内圈黄褐色绒毛，较贴培养基，外圈灰白色蓬松绒毛(图 2：C)。

chinaXiv:202211.00331v1



图 2 分离纯化后的真菌菌落形态特征图

Fig.2 Morphological characteristics of fungal colonies after isolation and purification

2.3 金铁锁根腐病病原菌的致病性测定

我们对分离纯化后的真菌去重复后进行了致病性测定，金铁锁组培苗分别接种了病原菌 PSD-1，PSD-2，PSD-3 的分生孢子悬浮液，3 d 后长出菌丝，1 周后组培苗从根部开始，朝着茎叶方向发黄，2 周后组培苗全部变黄，死亡，而对照组仍无症状。重复试验后获得相同的结果。

金铁锁盆栽苗分别接种了病原菌 PSD-1，PSD-2，PSD-3 的分生孢子悬浮液，1 个月后，叶子开始萎蔫但没有褪色，在中午前后光照强、蒸发量大时，植株上部叶片出现萎蔫，但夜间又能恢复。继续观察一段时间后，叶片萎蔫状况夜间也不能再恢复，叶片的绿色逐渐褪去，直至变成黄白色，叶片开始慢慢脱落。2 个月后，待叶片完全枯萎脱落后挖出金铁锁的根，发现根部颜色比栽种之前更深，根部软化、腐烂，与田间患病植株根的症状相同。而对照组仍无症状。重复试验后获得相同的结果。发病率分别为 60%，61.7%，71.7% (发病率=发病植株/植株总数×100%)。并且从发病金铁锁根上均能再分离到与初接菌株相同的分离物，确定为金铁锁根腐病病原菌，因此判断病原菌 PSD-1，PSD-2，PSD-3 对金铁锁的致病力较强。

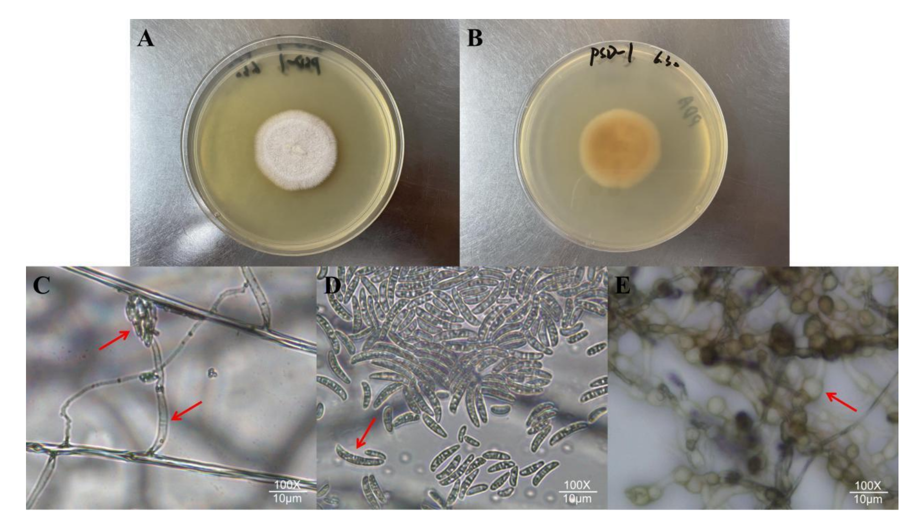
2.4 金铁锁根腐病病原菌的形态鉴定

PSD-1 接种于 PDA 培养基上，28 ℃培养 5 d 后，菌落呈近圆形，菌丝体较细，呈疏松绒毛状较贴培养基，菌落有轮转纹，内圈呈淡黄褐色，外圈边缘白色，随时间的推移内圈颜色逐渐朝外圈变深，菌落背面边缘呈白色，中间呈黄褐色，菌落直径约为 3.4 cm；小型分生孢子为卵圆形，着生于单出的分生孢子梗上；分生孢子梗细长；大型分生孢子较多，5~6 分隔，多为新月型；厚垣孢子近球形，多生于菌丝的顶端或中间，壁表光滑(图 3)。

培养 5 d 后，PSD-2 菌落呈不规则椭圆形，边缘呈锯齿状，菌丝较长，绒毛状，质地棉絮状，白色，菌落背面大部分呈白色，中间偶见黄色细轮纹，菌落长轴为约 3.7 cm，短轴为约 2.6 cm；小型分生孢子为肾形，偶见 2~5 分隔，着生于分生孢子梗上；分生孢子梗细长，呈树枝状分生；大型分生孢子 4~7 分隔，为镰刀型；厚垣孢子椭圆形，壁表光滑或粗糙。PSD-3 菌落呈类椭圆形，边缘不整齐，菌丝浓密，质地棉絮状，白色，菌落背面颜色呈白色，中间有黄色小点，菌落菌落长轴为约 3.3 cm，短轴为约 2.8 cm；小型分生孢子为肾型至卵圆形，着生于分生孢子梗上；分生孢子梗细长、分枝较少；大型分生孢子多为 1~3 分隔，为卵形；厚垣孢子不规则球形，多生于菌丝的顶端，壁表光滑。

chinaXiv:202211.00331v1

chinaXiv:202211.00331v1



A, B. PSD-1 的菌落形态；**C.** 小型分生孢子及分生孢子梗；**D.** 大型分生孢子；**E.** 厚垣孢子。标尺：**B~D:** 100 ×10 μm。

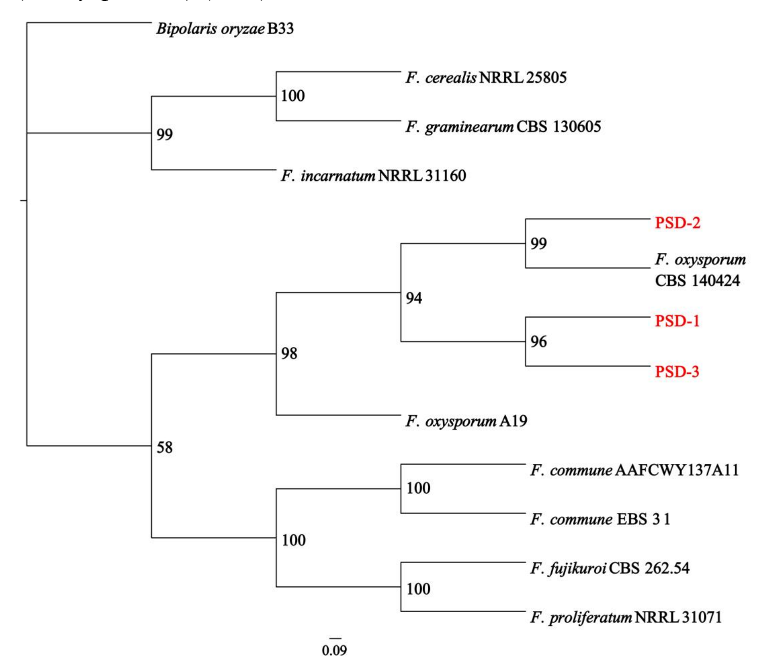
A, B. The colony morphology of PSD-1; **C.** Microconidia and conidiophore; **D.** Macroconidium; **E.** Chlamydospore. Scale bar: **B-D:** 100×10 μm.

图 3 以 PSD-1 为代表的菌落和菌体形态

Fig.3 Colony and morphology with the represent of PSD-1

2.5 金铁锁根腐病病原菌的分子生物学鉴定

经真菌 ITS 和 TEF-1α序列分析表明，PSD-1，PSD-2，PSD-3 与 *F. oxysporium* 相似性达 99%以上。基于 ITS 和 TEF-1α构建的系统发育树发现，菌株 PSD-1，PSD-2，PSD-3 都与 *F. oxysporium* A19 聚为一支，支持值达 98%，并与镰刀属的其他菌株分支明显，其中菌株 PSD-2 与模式菌株 *F. oxysporium* CBS 140424 聚到一起，支持值达 99%。基于上述多基因联合构建的供试菌株与 *F. oxysporium* 系统发育树结果和形态学特征，将 PSD-1，PSD-2，PSD-3 鉴定为尖孢镰刀菌(*F. oxysporium*) (图 4)。



编号 PSD-1、PSD-2、PSD-3 的菌株是从根腐病的金铁锁中分离得到的。

The strains numbered PSD-1, PSD-2 and PSD-3 were isolated from with *P. tunicoides* root rot.

图 4 基于 TEF-1α和 ITS 序列构建的 *F. oxysporum* 的贝叶斯(BI)系统发育树

Fig.4 Bayesian inference phylogenetic tree of *F. oxysporum* based on TEF-1α and ITS sequences

3 讨论

根腐病是一种常见的土传病害，对中草药根和茎具有毁灭性的危害(廖长宏等，2017)。目前，大量研究表明，一些镰刀属真菌是引起药用植物根腐病的主要病原菌之一(陈茂婷等，2020) 。本研究通过病原菌分离、柯赫氏法则验证(黄幸鸽等，2021)及病原菌形态学鉴定和分子生物学鉴定，首次分离鉴定了金铁锁根腐病的一种主要致病真菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。将分离得到的病原菌分别接种至健康的组培苗和盆栽苗，结果发现健康植株产生了与大田植株根腐病相似的症状，且发病率分别为60%，61.7%，71.7%。说明尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)是引起金铁锁根腐病的主要病原菌之一。Guo 等(2009)研究发现，引起三七根腐病的病原菌主要为腐皮镰刀菌(*F. solani.*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、恶疫霉病菌(*Phytophthora cactorum*)和草茎点霉 (*Phoma herbarum*)等。张礼维等(2015)结合形态及分子鉴定，分离得到的 61 株白术的根腐病病原菌均为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。由此可见，尖孢镰刀菌是引起植物根腐病中较为常见的一种镰刀菌属的病菌。我们对云南马龙栽培基地的金铁锁病原菌进行鉴定，分离得到的主要病原菌也为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)，这与他人的研究结果是一致的。然而，前人的研究中，许多植物的根腐病多由多种镰刀菌复合侵染所致，本研究中分离得到的 85 株真菌，均为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)，未见其他种类的病原菌。一是可能本研究采集病害的样本不够广泛，仅分离了云南马龙栽培基地的病害金铁锁，导致分离获得的病原菌比较单一。二是尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)是大多植物根腐病致病菌中的优势病原菌种，相对分离频率较高。陈思杰等(2021)研究亦发现，分离得到宁夏枸杞的致病菌中，尖孢镰刀菌在分离出的镰刀菌中占据优势，其他镰刀菌分离频率相对较低。

同时，该研究基于ITS和TEF-1α分子片段构建的系统发育树，结果发现菌株PSD-1，PSD-2，PSD-3 都与 *F. oxysporium* A19 聚为一支，并与镰刀属的其他菌株分支明显，其中菌株 PSD-2 与模式菌株 *F. oxysporium* CBS 140424 聚到一起，支持值达 99%。镰刀菌属是真菌中最难鉴定的种属之一，其由于形态复杂，在生长过程中形态受环境的影响变异较大，单纯依据形态学很难准确鉴定到种(邢安，2017)。在该研究中，亦发现菌株 PSD-1，PSD-2，PSD-3 虽都为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)，但菌落形态还是存在一定的差异。近年来利用分子标记技术辅助鉴定镰刀菌的方法已被广泛应用，可以弥补形态学鉴定的不足。曹瑱艳等(2020)使用镰刀菌种特异性引物并结合 ITS 和 TEF 序列分析及形态学鉴定确定了铁皮石斛根腐病的 4 种病原真菌。迟惠荣等(2019)根据形态学、rDNA-ITS 和 TEF-1α序列同源性分析，确定了导致多花黄精叶枯病的病原菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。由于镰刀菌种类繁多，形态变异复杂，包括很多亲缘关系较近的种及复合种，所以单一片段很难对其准确鉴定。该研究在形态学鉴定的基础上，结合 ITS 和 TEF-1α序列进行联合分析，首次鉴定引发金铁锁根腐病的主要病原菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporium*)，得到了可靠的分类鉴定结果。

综上所述，本研究调查了云南省金铁锁根腐病的发生状况，首次分离并鉴定引起金铁锁根腐病的主要病原菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。而金铁锁根腐病的防治是下一步工作的重点，其中生物防治菌株的挖掘和筛选是金铁锁根腐病防治的重要途径。生防菌较化学农药而言，具有能改善环境污染、降低农药残留、保护生态环境等优点。近年来，基于高通量组学测序技术挖掘与验证药用植物的生防菌已成为科学研究的热点。通过微生物组学和宏基因组学分析，探究金铁锁根腐病与根际土壤微生物群落的关系，筛选出用于生物防治剂的候选菌株，并通过纯培养手段获得并富集拮抗活性菌株，可为金铁锁根腐病的防治提供新的思路。同时，基于现在云南省金铁锁的栽培现状，结合栽培措施(选育优良抗病品种，脱毒中药种苗的规模化应用，对土壤进行消毒处理，使用土壤改良剂，进行合理的轮作)，化学防控(使用甲霜灵等杀菌剂)和生物防控(引入拮抗菌和接种有益微生物)等多种措施联合使用，能更有效地进行金铁锁根腐病防治。

chinaXiv:202211.00331v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202211.00331v1

参考文献：

CAO M, YU M, TANG XY, et al., 2022. Isolation and identification of pathogens of *Atractylodes lancea* root rot disease and fungicide screening in laboratory[J/OL]. J Chin Med Mat, 45(8): 1779-1785. [曹敏，余米，唐祥友，等，2022. 茅苍术根腐病主要病原菌的分离鉴定及室内药剂筛选[J/OL]. 中药材，45(8): 1779-1785.]

CAO ZY, YANG YH, SHENTU XP, et al., 2020. Identification of the pathogenic fungi of root rot of traditional medicinal *Dendrobium officinale* in Zhejiang Province[J]. J Plant Prot, 47 (1): 178-186. [曹瑱艳，杨怡华，申屠旭萍，等，2020. 浙江省铁皮石斛根腐病病原真菌的鉴定. 植物保护学报，47(1): 178-186.]

CHEN MT, HU QQ, SHU JQ, et al., 2020. Isolation and identification of pathogens causing root rot on *Aconitum carmichaelii* Debx[J]. Microbiol Chin, 47(8): 2450-2457. [陈茂婷，胡琪琪，书剑琴，等，2020. 乌头根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报，47(8): 2450-2457.]

CHEN SJ, DU J, ZHANG T, et al., 2021. Studies on the pathogen of root rot of *Lycium barbarum* in Ningxia[J]. J Agric Sci, 42(4): 7-11. [陈思杰，杜娟，张涛，等，2021. 宁夏枸杞根腐病病原研究[J]. 农业科学研究，2021, 42(4): 7-11.]

CHI HR, 2019. The study on the pathogen identification of the leaf blight of *Polveonatum cyrtonema* Hua and the plant growth promotion and biocontrol effect of *Bacillus velezensis*[D]. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang University. [迟惠荣，2019. 多花黄精叶枯病病原菌鉴定及贝莱斯芽胞杆菌防病促生效果研究[D]. 杭州：浙江大学.]

FU LG, 1991. China plant red date book[M]. Science Press. [傅立国，1991. 中国植物红皮书[M]. 科学出版社.]

GAO F, REN XX, WANG ML, et al., 2015. Research progress in root rot diseases of Chinese herbal medicine and control strategy by antagonistic microorganisms[J]. Chin J Chin Mat Med, 40(21): 4122-4126. [高芬，任小霞，王梦亮，等，2015. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展[J]. 中国中药杂志，40(21): 4122-4126.]

GAO F, ZHAO XX, QIN XM, et al., 2018. Analysis of dominant pathogen community causing *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root rot in Shanxi Province[J]. J Plant Prot, 45(4): 878-885. [高芬, 赵晓霞, 秦雪梅，等，2018. 山西省蒙古黄芪根腐病优势致病菌群分析[J]. 植物保护学报，45(4): 878-885.

GUO R J, LIU X Z, Li S, et al., 2009. In vitro inhibition of fungal root-rot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria[J]. Plant Pathology Journal, 25(1): 70-76.

HU CG, QIU DW, ZHAO JH, et al., 2002. Textual research on materia medica of Miao medicine *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu[J]. J Guiyang Coll Trad Chin Med, 24(3): 1-2. [胡成刚，邱德文，赵俊华，等，2002. 苗药金铁锁的本草考证[J]. 贵阳中医学院学报，24(3): 1-2.]

HUANG XG, LI MY, YANG JS, et al., 2021. Isolation, identification and biological characterization of the pathogenic fungus for *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 36(5): 2908-2911. [黄幸鸽，李美芽，杨蒋舜，等，2021. 白术根腐病病原菌的分离鉴定及特性研究[J]. 中华中医药杂志，36(5): 2908-2911.]

LAN M, 2004. The native herb of southern yunnan[M]. Yunnan Science and Technology Press. [兰茂，2004. 滇南本草[M]. 云南科技出版社.]

LI JH, YAN ZY, LAN Y, et al., 2015. Identification of pathogens causing root rot disease on *Ligusticum* chuanxiong in Sichuan[J]. J Chin Med Mat, 38(3): 443-446. [李佳穗，严铸云，兰英，等，2015. 四川主产区川芎根腐病病原菌鉴定[J]. 中药材，38(3): 443-446.]

LI ZF, BAI XL, JIAO S, et al., 2021. A simplified synthetic community rescues *Astragalus mongholicus* from root rot disease by activating plant-induced systemic resistance[J]. Microbiome, 9(1): 1-20.

LIANG JJ, PANG RJ, NING JQ, et al., 2019. Isolation and identification of *Fusarium* species causing the *Medicago sativa* root rot in Shaanxi Province[J]. J Plant Prot, 46(3): 715-716. [梁嘉俊，庞仁江，宁军权，等，2019. 陕西省紫花苜蓿根腐病致病镰孢菌的分离与鉴定[J].植物保护学报，46(3): 715-716.]

LIAO CH, CHEN JW, LÜ WW, et al., 2017. Research progress on root rot of root and rhizome medicinal plants[J]. J Chin Med Mat, 40(2): 492-497. [廖长宏，陈军文，吕婉婉，等，2017. 根和根茎类药用植物根腐病研究进展[J]. 中药材，40(2): 492-497.]

LUO YJ, 2018. Cultivating techniques of mulching film of medicinal *Psammosilene tunicoides*[J]. Yunnan Agric Sci Technol, 47 (3): 28-29. [罗映菊，2018. 药用植物金铁锁覆膜栽培技术[J]. 云南农业科技，47(3): 28-29.]

LV JF, LI ZL, CHEN GF, 2018. Cultivation technology of *Psammosilene tunicoides*[J]. Yunnan Agric, 33(4): 58-59. [吕金富，李忠林，陈国发，2018. 金铁锁栽培技术[J]. 云南农业，33(4): 58-59.]

MAHARACHCHIKUMBURA SSN, GUO LD, CAI L, et al., 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. Fungal Divers, 56(1): 95-129.

MU XR, MA YY, YANG ZZ, et al., 2014. Research advance on the control of root rot disease of medical plants[J]. Pharm Clin Chin Mat Med, 5(2): 5-8. [穆向荣，马逾英，杨枝中，等，2014. 药用植物根腐病防治的研究进展[J]. 中药与临床，5(2): 5-8.]

RONQUIST F, HUELSENBECK JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics, 19(12): 1572-1574.

SAMPIETRO D A, MARÍN P, IGLESIAS J, et al, 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina[J]. Fungal biol, 114(1): 74-81.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al., (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 28(10): 2731-2739.

TAPANI YLIM, PAAVANEN-HUHTALA S, BULAT SA, et al, 2002. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex-a polyphasic approach[J]. Mycol Res, 106(6): 655-669.

WANG SW, WANG QH, LI XP, et al., 2018. Progress in molecular identification in the genus *Fusarium* and its important applications[J]. Microbiol Chin, 45(4): 907-919. [王世伟，王卿惠，李小鹏，等，2018. 镰刀菌分子鉴定与重要应用的研究进展[J]. 微生物学通报，45(4): 907-919.]

WANG XY, XU JY, QIU DW, et al., 2006. Study on the anti-inflammatory effects and possible mechanism of total saponins of *Psammosilene tunicoids*[J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2(5): 56-58. [王学勇，许建阳，邱德文，等，2006. 金铁锁总皂苷抗炎镇痛作用及作用机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2(5): 56-58.]

WEN ZY, LI DH, DAI MY, et al., 2019. Biological characteristics of *Fusarium oxysporu*m, a pathogen of *Panax notoginseng* root rot[J]. J Chin Med Mat, 42(9): 1978-1984. [文增叶，李定华，代梦瑶，等，2019. 三七根腐病病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性分析[J]. 中药材，42(9): 1978-1984.]

chinaXiv:202211.00331v1

ChinaXiv合作期刊

WU XL, WANG Y, LIU F, et al., 2020. Identification of *Coptis chinensis* root rot disease pathogenic *Fusarium* spp. Fung[J]. Chin J Chin Mat Med, 45(6): 1323-1328. [伍晓丽，王钰，刘飞，等，2020. 黄连根腐病镰刀菌属病原真菌鉴定[J].中国中药杂志，45(6): 1323-1328.]
XIE AN, XU HF, ZHANG ZL, et al., 2020. Research development of *Fusarium*[J]. J Hubei Eng Univ, 40(6): 37-41. [谢安娜，徐浩飞，张志林，等，2020. 致病镰刀菌的研究进展[J]. 湖北工程学院学报，40(6): 37-41.]
XING A, 2017. Classification of *Fusarium* spp. from main crops and rhizosphere soil in Heilongjiang Province[D]. Harbin: Northeast Agricultural University. [邢安，2017. 黑龙江省主要作物及其根际土壤中的镰孢菌分类研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学.]
YANG LY, SU ZC, CHENG YH, et al., 2020. Best harvesting time of *Psammosilene tunicoides*[J]. SW Chin J Agric Sci, 33(9): 2048-2054. [杨丽云，苏泽春，程远辉，等，2020. 金铁锁最佳采收期研究[J]. 西南农业学报，33(9): 2048-2054.]
YAO TM, FU JZ, NAN JJ, et al., 2020. Study on *Pinellia ternata* rot caused by combined infection of *Fusarium oxysporum* and *Erwiniella*[J]. Gansu Agric Sci Technol, 58(7): 54-58. [姚天明，伏建增，南建军，等，2020. 尖孢镰刀菌及欧文氏杆菌复合侵染引起的半夏腐烂病研究[J]. 甘肃农业科技，58(7): 54-58.]
ZHANG J, WAN LX, LU LZ, 2019. Study on the control effect of microbial fertilizer on root rot of *Panax ginseng* in continuous cropping land [J]. Ginseng Res, 31(4): 27-30. [张静，万凌霄，卢丽珍，2019. 微生物菌剂对重茬地人参根腐病防治效果的研究[J]. 人参研究，31(4): 27-30.]
ZHANG JZ, WANG W, 2018. Discussion on standard molds and comparison of partial condition factors in antimicrobial tests[J]. Ind Microbiol, 48(1): 49-53. [张继忠，王薇，2018. 抗菌防霉试验中标准霉菌的讨论与部分条件因素的比较[J]. 工业微生物. 48(1): 49-53.]
ZHANG LW, 2015. Identification of pathogen and control of root rot of *Atractylodes macrocephala* Koidz. in Guizhou[D]. Master Thesis. Guiyang: Guizhou University. [张礼维，2015. 贵州白术根腐病病原鉴定及防治研究[D]. 贵阳：贵州大学.]
ZHOU XX, WANG L, TIAN Y, et al., 2013. Study on the chemical constituents of *Psammosilene tunicoides*[J]. Chin J Chin Mat Med, 38(20): 3507-3509. [周欣，王坌，田园，等，2013. 金铁锁化学成分研究[J]. 中国中药杂志，38(20): 3507-3509.]
ZHOU ZY, YAN T, ZHNEG L, et al., 2021. Advances in pharmaceutical research of *Psammosilene* radix[J]. Chin Pharm, 24(12): 2231-2237. [周祖英，晏婷，郑林，等，2021. 金铁锁的药学研究进展[J]. 中国药师，24(12): 2231-2237.]
ZHU CC, XU SK, QIAN ZG, et al., 2007. Study on the geographic distribution of *Psammosilene tunicoides* W.C.Wu et C.Y.Wu[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 24(1): 28-31. [朱常成，徐士奎，钱子刚，等，2007. 金铁锁的地理分布及分布区的初步分析[J]. 中国现代应用药学，24(1): 28-31.]
ZHU CC, YIN ZL, 2017. Investigation and Research on the Resources of Endangered Medicinal Plant *Psammosilene tunicoides*[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 26(13): 133-138. [朱常成，尹子丽，2017. 濒危药用植物金铁锁的资源调查研究[J]. 中国民族民间医药，26(13): 133-138.]
ZHU CY, LIU XL, DONG J, et al., 2003. Isolation and identification of the pathogens causing root rot disease of Chinese *Ephedra*[J]. Acta Phytopathol Sin, 33(3): 193-197. [朱春雨，刘西莉，董槿，等，2003. 麻黄根腐病病原物的分离及鉴定[J]. 植物病理学报，33(3): 193-197.]

chinaXiv:202211.00331v1